

Über die Einwirkung von proteolytischen Fermenten auf Clupein.

Von

F. Rogoziński (Krakau).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg.)

(Der Redaktion zugegangen am 11. Juni 1912.)

Das Verhalten der Protamine gegenüber den proteolytischen Fermenten ist von bedeutendem theoretischen Interesse. Man könnte erwarten, daß sich hier, bei dem relativ einfachen Bau dieser Körper, die Verhältnisse übersichtlicher erweisen als bei anderen, komplizierteren Eiweißkörpern. Da bisher in dieser Richtung nur wenige systematische Untersuchungen vorliegen, habe ich, dem Vorschlag Herrn Prof. A. Kossels folgend, die Bearbeitung dieser Frage unternommen.

Es mögen zunächst die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen über den proteolytischen Abbau der Protamine Erwähnung finden. Qualitativ ist von A. Kossel und A. Mathews¹⁾ festgestellt worden, daß Pepsinsalzsäure bei Protaminen, speziell bei Salmin, keinen Abbau bewirkt, daß dagegen diese Körper durch Einwirkung von Trypsin schnell in ihre Bausteine zerlegt werden. Ebenso konnte Cohnheim²⁾ konstatieren, daß Clupein durch Erepsin in kurzer Zeit abgebaut wird. Über den Verlauf der Spaltung und deren Umfang bringen aber die genannten Arbeiten keinen Aufschluß. Die einzige Untersuchung, die auf Erforschung der quantitativen Verhältnisse bei der proteolytischen Spaltung der Protamine gerichtet ist, ist von Takemura³⁾ ausgeführt worden. Derselbe hat die Wirkung einer Reihe von proteolytischen Fermenten auf Clupein untersucht. Der Verlauf der Spaltung wurde dabei nach der von Hedin⁴⁾ angegebenen Methode der Gerbsäurefällung verfolgt. Der Verfasser selbst beurteilt die angewandte Methode in folgenden Worten:

«Leider ist aber auch diese Methode, die beim Casein ausgezeichnete Resultate ergeben hat, für das Clupein nicht

einwandfrei. Denn eine gewisse Menge des Clupeins scheint der Gerbsäurefällung zu entgehen. Auch sind die Bedingungen, welche die Fällbarkeit der Protamine durch Gerbsäure beeinflussen, noch nicht hinreichend bekannt. Immerhin ist es möglich, das Fortschreiten der Hydrolyse zu verfolgen, indem man die Zahlen der durch Gerbsäure nicht fällbaren Substanz, welche sich zu verschiedenen Zeiten nach Beginn der Fermentwirkung ergeben, untereinander vergleicht.»

Auf Grund dieser Erwägung betont Takemura selbst, daß seine Untersuchungen bloß den Charakter vorläufiger Versuche tragen.

Das Ergebnis dieser Versuche mag hier in aller Kürze wiedergegeben werden. Es wurden folgende Fermente, bezw. fermenthaltige Organsäfte, auf ihre Wirksamkeit gegen Clupein geprüft: als pepsinhaltige Präparate: ein Extrakt der Schleimhaut des Schweinemagens; dasselbe war weder in salzsaurer noch essigsaurer Lösung wirksam; Fistelmagensaft des Hundes, der in salzsaurer Lösung unwirksam, in essigsaurer Lösung dagegen stark wirksam war; ein käufliches Pepsinpräparat, welches umgekehrt in salzsaurer, aber nicht in essigsaurer Lösung wirksam war. Starke Spaltung wurde konstatiert unter Einwirkung des Trypsins, welches fast völlige Zersetzung des Protamins herbeiführte. Weniger umfangreiche, aber immerhin bedeutende Spaltung wurde durch die Lieno- β -Protease in essigsaurer Lösung, durch Hefepreßsaft und durch Papayotin bewirkt. Der Verfasser faßt das Ergebnis seiner Untersuchung in folgenden Worten zusammen: «Die obigen Versuche lassen eine Tatsache sehr deutlich hervortreten: nämlich die Existenz einer Reihe von Enzymen (« β -Proteasen»), die in schwachsaurer Lösung eine partielle Zerlegung der Protamine (wie der komplizierteren Proteinstoffe) bewirken. Zu diesen gehören die «Lieno- β -Protease» (Hedins), die «Endotryptase» (Hahn und Geret), sowie das Papayotin. Die Wirkung des Pepsins, die sich in einzelnen Fällen und nur in geringerem Maße zu erkennen gab, ist wahrscheinlich auf beigemischte β -Proteasen zurückzuführen.»

Bei dem vorläufigen Charakter der Untersuchung von

Takemura lag der Gedanke nahe, deren Ergebnisse durch Wiederholung zu prüfen. Vor allem galt es dabei, eine geeignete Methode in Anwendung zu bringen.

Da nach unseren jetzigen Vorstellungen der proteolytische Abbau auf Sprengung von Imidbindungen beruht, so können eine richtige Vorstellung über den Verlauf der Proteolyse nur solche Methoden geben, welche es gestatten, die Zahl der freigewordenen Aminogruppen in verschiedenen Stadien der Fermentwirkung messend zu verfolgen. Diesen Forderungen entspricht vor allem, wie bekannt, die von Sörensen⁵⁾ angegebene Methode der «Formoltitrierung». Die nach dieser auf streng chemischer Grundlage basierenden Methode gewonnenen Ergebnisse decken sich aber keineswegs mit denjenigen, die nach der Gerbsäurefällung-Methode gewonnen werden. Als Beweis sei aus den umfangreichen Ergebnissen Sörensens nur ein besonders prägnantes Beispiel angeführt: Bei Pepsinverdauung des genuinen Eiereiweißes betrug in 20 ccm des Verdauungsgemisches im Laufe von 150 Stunden die Zunahme an durch Gerbsäure nichtfällbarem Stickstoff 33,80 mg, diejenige an «formoltitrierbarem» Stickstoff dagegen nur 7,84 mg. Nach der ersteren Methode müßte also die Spaltung als über viermal stärker, als nach der letzteren Methode gemessen, bezeichnet werden. Neben der Sörensenschen Methode kam für meine Zwecke noch die von van Slyke⁶⁾ angegebene «Methode zur quantitativen Bestimmung der aliphatischen Aminogruppen» in Betracht. Es sollten somit in der vorliegenden Untersuchung zunächst die beiden auf chemischer Unterlage basierenden Methoden zur Verfolgung der Proteolyse einem Vergleich unterworfen werden, um zwischen ihnen eine Wahl treffen zu können, weiterhin aber sollte mit Hilfe der gewählten Methode die Einwirkung einiger proteolytischen Fermente auf Clupein quantitativ verfolgt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind im folgenden zusammengestellt.

Experimenteller Teil.

Der Vergleich zwischen beiden Methoden war um so nötiger, da nach den Angaben von Sörensen und van Slyke

einzelne der bei saurer Hydrolyse der Eiweißkörper entstehenden Aminosäuren gewisse Unregelmäßigkeiten in bezug auf ihre Reaktionsfähigkeit mit den angewandten Reagenzien darbieten. So soll bei der Formoltitrierung das Prolin zu wenig, das Tyrosin zu viel Lauge verbrauchen. In dem Apparat von van Slyke reagiert Lysin mit beiden Aminogruppen, Prolin und Oxyprolin reagieren gar nicht, Ammoniak nur langsam usw.

Es war daher nötig, durch strenge Innehaltung der gewählten Versuchsbedingungen bei allen Versuchen, deren Ergebnisse untereinander möglichst vergleichbar zu machen.

Die Formoltitrierung wurde stets genau nach den Angaben von Sörensen in 20 ccm der untersuchten Lösung unter Anwendung von Natronlauge und Phenolphthalein ausgeführt. Die Ergebnisse sind in allen Fällen auf Stickstoff umgerechnet worden.

Die Bestimmungen nach van Slyke sind in seinem Apparat unter Zusatz von Amylalkohol ausgeführt worden. Die Reaktionsdauer war stets 5 Minuten. Da zur Bestimmung stets 10 ccm Verdauungsflüssigkeit verwendet wurde, so entsprechen die gewonnenen Zahlen direkt denjenigen, die nach Sörensen in 20 ccm der gleichen Lösung gefunden wurden.

Zum Vergleich beider Methoden wurden zunächst einige Versuche mit Trypsin und Pankreatin, deren Wirkung am Witte-Pepton, Edestin und Clupeinsulfat verfolgt wurde, angestellt. Die Peptonlösung wurde nach Sörensen (l. c.) dargestellt, das Clupeinsulfat aus trockenem Heringssperma nach A. Kossel, das Edestin aus entfetteten Hanfsamen nach der üblichen Methode dargestellt. Die Verdauung wurde stets unter Toluol, im Brutschrank bei ca. 37° geführt. Die Ergebnisse der Versuche sind im folgenden zusammengestellt:

Versuch I.

250 ccm ca. 4%iger Lösung von Witte-Pepton + 0,15 g Trypsin (Grübler) + 20 ccm $n/5$ -Natronlauge + Wasser bis zu 500 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 54,04 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg		Differenz mg N	In % des Gesamt-N	
	Sörensen	v. Slyke		Sörensen	v. Slyke
0	6,44	6,50	— 0,06	11,92	12,03
24 Stunden	16,24	11,63	4,61	30,05	21,51
2 mal 24 Std.	17,64	12,29	5,35	32,64	22,74
3 „ 24 „	18,90	14,33	4,57	34,97	26,52
4 „ 24 „	19,46	14,07	5,39	36,01	26,04
7 „ 24 „	20,30	16,26	4,04	37,56	30,09

Versuch II.

500 ccm ca. 4%iger Lösung von Witte-Pepton + 0,3 g Pankreatin (Rhenania) + 40 ccm $\frac{n}{s}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 1000 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 57,47 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg		Differenz mg N	In % des Gesamt-N	
	Sörensen	v. Slyke		Sörensen	v. Slyke
0	7,56	6,77	0,79	13,15	11,78
6 Stunden	15,68	11,43	4,25	27,28	19,89
24 „	19,32	13,24	6,08	33,62	23,04
2 mal 24 Std.	21,28	17,98	3,30	37,03	31,29
3 „ 24 „	21,70	16,98	4,72	37,76	29,55
4 „ 24 „	22,26	17,43	4,83	38,73	30,33
7 „ 24 „	22,68	18,32	4,36	39,46	31,88
17 „ 24 „	24,08	16,81	7,27	41,90	29,25
55 „ 24 „	25,76	—	—	44,82	—

Versuch III.

5 g Edestin + 0,2 g Pankreatin (Rhenania) + 20 ccm $\frac{n}{s}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 500 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 35,28 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg		Differenz mg N	In % des Gesamt-N	
	Sörensen	v. Slyke		Sörensen	v. Slyke
0	2,24	1,93	0,31	6,35	5,47
6 Stunden	8,40	6,52	1,88	23,81	18,48
24 „	12,18	8,76	3,42	34,52	24,83
2 mal 24 Std.	13,22	9,74	3,48	37,47	27,61
7 „ 24 „	14,28	11,74	2,54	40,48	33,28
14 „ 24 „	15,40	11,47	3,93	43,65	32,51
47 „ 24 „	17,64	—	—	50,00	—

Versuch IV.

5 g Clupeinsulfat + 0,2 g Pankreatin (Rhenania) + 20 ccm n₃-Natronlauge + Wasser bis zu 500 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 47,60 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg		Differenz mg N	In % des Gesamt-N	
	Sörensen	v. Slyke		Sörensen	v. Slyke
0	2,80	2,57	0,23	5,88	5,40
6 Stunden	7,00	5,82	1,18	14,71	12,23
24 „	9,24	7,25	1,99	19,41	15,23
2 mal 24 Std.	9,66	7,15	2,51	20,29	15,02
7 „ 24 „	10,22	8,18	2,04	21,47	17,18
14 „ 24 „	10,50	8,76	1,74	22,06	18,41
47 „ 24 „	11,90	—	—	25,00	—

Zu den obenstehenden Tabellen ist folgendes zu bemerken: offenbar eignen sich die beiden angewandten Methoden zur Verfolgung der Proteolyse; jedoch scheint die Methode von Sörensen etwas schärfere und sicherere Resultate zu geben. Selbst in den Fällen, wo es sich um minimale Zunahmen des Aminostickstoffs handelte, wie in späteren Stadien des Versuchs II, sind die nach dieser Methode erhaltenen Zahlen durchaus regelmäßig und entsprechend dem theoretisch postulierten Verlauf der Reaktion, während bei den Bestimmungen nach van Slyke wiederholt unregelmäßige kleine Schwankungen auftreten. Wie zu erwarten war, gibt letztere Methode wesentlich niedrigere Resultate. Dies ist wahrscheinlich vor allem durch Abspaltung von Prolin und Oxyprolin bedingt. Wäre es zulässig, aus dem vorstehenden, allerdings unzureichenden Material irgend welche Schlüsse in dieser Hinsicht zu ziehen, so müßte man glauben, die erwähnte Abspaltung fände bereits in ersten Stadien der Verdauung statt. In der Tat scheint die Differenz schon in den ersten 24 Stunden der Verdauung ihr Maximum zu erreichen und im weiteren Verlauf der Reaktion kaum zuzunehmen.

Wenn diese Vermutung zutrifft, so würden die nach Sörensen gewonnenen Zahlen der Wirklichkeit näher kommen. Da zudem diese Methode bedeutend bequemer und zugleich

schärfer ist, habe ich sie in den folgenden Versuchen ausschließlich in Anwendung gebracht; nur in den Fällen, wo sich die Formoltitration infolge der starken Eigenfärbung der Verdauungsflüssigkeiten schlecht ausführen ließ, habe ich zu der Methode von van Slyke Zuflucht gehabt.

Die vorstehenden Versuche beweisen, daß der Umfang der Spaltung bei einzelnen Eiweißstoffen verschieden ist. Bei Pepton sind im Laufe von zwei Wochen durch Pankreatin ca. 40% des Gesamtstickstoffs «formoltitrierbar» geworden; beim Edestin ist die entsprechende Zahl ca. 43%, bei Clupein dagegen ca. 22%. Um den Umfang der Spaltung des Clupeins unter Einwirkung verschiedener Fermente beurteilen zu können, mußte man zunächst feststellen, wie hoch sich im günstigsten Falle, also nach Sprengung sämtlicher Polypeptidverbindungen, das Verhältnis vom «formoltitrierbaren» zum Gesamtstickstoff stellt. Um dies zu ermitteln, wurde Clupeinsulfat der vollständigen Hydrolyse unterworfen und die Titration nach Sørensen in der resultierenden Lösung unternommen.

Der Versuch wurde in folgender Weise ausgeführt: ca. 2 g Clupeinsulfat wurden mit 20 ccm 33% iger Schwefelsäure 12 Stunden lang am Rückflußkühler gekocht. Die Lösung wurde nach dem Erkalten mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. In zwei Proben von je 10 ccm sind Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl ausgeführt worden, die übereinstimmend in 10 ccm 47,53 mg N ergaben. Die übrige Lösung (mit 380,24 mg N) wurde mit Barythydrat gegen Lackmus genau neutral gemacht; der Niederschlag von Baryumsulfat abfiltriert, ausgekocht und wiederholt ausgewaschen; das Filtrat wurde mit Waschwasser vereinigt und auf dem Wasserbade eingeengt; sodann auf 250 ccm gebracht. In 20 ccm dieser Lösung wurde nach Kjeldahl 28,56 mg N gefunden. Es sind somit trotz sorgfältigen Auswaschens ca. 23 mg Stickstoff im Baryumsulfatniederschlag geblieben. In der neutralen Lösung wurden sowohl nach Sørensen wie nach van Slyke Bestimmungen gemacht und zwar mit folgendem Ergebnis:

nach Sørensen: 10,08 mg N = 35,29% des Gesamt-N.

nach van Slyke: 7,70 mg N = 26,96% des Gesamt-N.

Bei vollständiger Spaltung des Clupeinmoleküls beträgt also der „formoltitrierbare“ Stickstoff über ein Drittel des Gesamtstickstoffs.

Diese Zahlen befinden sich in ziemlich guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der hydrolytischen Spaltung des Clupeins. Nach der Hydrolyse findet man ungefähr 88% des Gesamtstickstoffs als Argininstickstoff, den Rest als «Monoaminostickstoff». Da nun ein Viertel des Argininstickstoffs und der ganze Monoaminostickstoff formoltitrierbar sind, so müßten von 100 Teilen Clupeinstickstoff nach der Hydrolyse $\frac{88}{4} + 12$, d. i. 34 Teile formoltitrierbar sein. Diese Zahl stimmt mit der gefundenen 35,3 soweit überein, als sich bei der gewiß nicht ohne Nebenreaktionen verlaufenden Hydrolyse durch Schwefelsäure erwarten läßt.

Nach diesen vorläufigen Versuchen habe ich die systematische Untersuchung der Einwirkung proteolytischer Fermente auf Clupein unternommen. Zunächst wurde Trypsin (Grübler) untersucht, um seine Wirkung mit derjenigen des Pankreatins im Versuch IV zu vergleichen.

Versuch V.

1,5 g Clupeinsulfat + 0,2 g Trypsin (Grübler) + 6 ccm $\frac{n}{5}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 150 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 49,00 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	In % des Gesamt-N
$\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur	9,24	18,86
6 Std. im Brutschrank	13,30	27,14
24 » » »	14,00	28,57
4 mal 24 » » »	15,26	31,14
12 » 24 » » »	17,22	35,14

Das untersuchte Präparat scheint somit das Pankreatin an Wirksamkeit sogar zu übertreffen und in relativ kurzer Zeit eine vollständige Spaltung des Clupeins zu bewirken.

Da bekanntlich die Versuche mit käuflichen Pankreasextraktpräparaten keine sicheren Schlüsse betreffend die Wir-

kung des Pankreassaftes zulassen, wurde die Wirksamkeit des letzteren geprüft. Den benutzten Pankreassaft verdanke ich Herrn Prof. O. Cohnheim;⁷⁾ er wurde aus einer Duodenalfistel beim Hund auf Injektion von Salzsäure frei von Galle und Mageninhalt gewonnen.

Der Stickstoffgehalt des Saftes betrug 6,44 mg N in 5 ccm; 2 ccm Saft + 20 ccm Wasser, nach Sörensen titriert, entsprachen 0,7 mg N. In der folgenden Tabelle ist der «formol-titrierbare» Stickstoff in Prozenten des Clupeinstickstoffs, unter Abzug des Stickstoffs vom Saft, berechnet.

Versuch VI.

2,5 g Clupeinsulfat + 25 ccm filtrierter Pankreasfistelsaft + 10 ccm $\frac{n}{6}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 250 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 46,70 mg Clupeinstickstoff (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sörensen)	In % des Gesamt-N
$\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur	7,70	15,63
6 Std. im Brutschrank	12,60	25,57
24 > > >	14,70	29,83
2 mal 24 > > >	15,68	31,82
7 > 24 > > >	16,52	33,52
40 > 24 > > >	17,08	34,66

Dieser Versuch beweist, daß die Wirkung des Saftes ebenso stark und weitgehend ist, wie diejenige der käuflichen Trypsinpräparate. In diesem Falle scheinen also die den letzteren etwa beigemengten Proteasen keine Rolle zu spielen.

In den ersten 30 Minuten, die von der Vermischung des Saftes mit der Clupeinlösung bis zur Titration verflossen, hatte bereits eine nicht unbeträchtliche Spaltung des Clupeins stattgefunden. In dem folgenden Versuch wurde daher die Titration möglichst rasch nach dem Zusammenbringen der Lösungen ausgeführt.

Versuch VII.

1 g Clupeinsulfat + 10 ccm filtrierter Pankreasfistelsaft + 4 ccm $\frac{n}{6}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 100 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 46,70 mg Clupeinstickstoff (nach Versuch VI berechnet).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	In % des Gesamt-N
0	4,48	9,09
2 Stunden	11,34	23,01
24 „	13,02	26,42

Wie ersichtlich, fand schon während der kurzen, zur Ausführung der Titration nötigen Zeit eine gewisse Zersetzung statt. Nach Verlauf von 2 Stunden ist die Spaltung bereits sehr weit fortgeschritten.

In bezug auf die Wirkung der tryptischen Fermente konnte ich also im ganzen die früheren Angaben, speziell diejenigen von Takemura, bestätigen. Sie wurden ergänzt durch die genauere quantitative Verfolgung des Verlaufs der Spaltung und die Untersuchung der Wirksamkeit des reinen Pankreasfistelsaftes.

Anders verhält es sich mit Pepsin. Wie bereits erwähnt, ist durch die grundlegenden Untersuchungen von A. Kossel und A. Mathews festgestellt worden, daß Pepsinsalzsäure bei Protaminen keinen Abbau bewirkt. Dagegen fand Takemura bei einem käuflichen Pepsinpräparat starke Wirkung auf Clupein in salzsaurer Lösung, und mit Magenfistelsaft des Hundes in essigsaurer Lösung. Dagegen hatte das Extrakt der Schleimhaut des Schweinemagens und der Magenfistelsaft des Hundes in salzsaurer Lösung keine Wirkung und ebensowenig das käufliche Präparat in essigsaurer Lösung. Diese Widersprüche sind von Takemura nicht aufgeklärt worden; wahrscheinlich handelte es sich um dem Pepsin beigemengte Peptasen, vielleicht aber sind auch die Übelstände der angewandten Gerbsäuremethode bei der Beurteilung der Resultate in Betracht zu ziehen.

Ich habe die Wirkung des Pepsins (Grübler) auf Clupeinsulfat in salzsaurer Lösung untersucht. Die Wirksamkeit des Präparates wurde am Fibrin und Edestin geprüft und stark gefunden.

Versuch VIII.

1 g Clupeinsulfat + 0,1 g Pepsin (Grübler) + 30 ccm $\frac{n}{s}$ -Salzsäure + Wasser bis zu 100 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 47,60 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	In % des Gesamt-N
0	2,80	5,88
6 Stunden	2,52	5,29
24 „	2,52	5,29

Versuch IX.

1,5 g Clupeinsulfat + 0,2 g Pepsin (Grübler) + 45 ccm $\frac{n}{s}$ -Salzsäure + Wasser bis zu 150 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 48,44 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	In % des Gesamt-N
0	2,66	5,49
24 Stunden	2,80	5,78
7 mal 24 Stunden	2,52	5,20

Wie ersichtlich, konnte in keinem der beiden Versuche irgend eine Spaltung des Clupeins konstatiert werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Takemura stehen somit die meinigen im besten Einklang mit den Beobachtungen von A. Kossel und A. Mathews.

Als weiteres proteolytisches Ferment wurde Papayotin (Merck) untersucht, sowohl in schwach alkalischer, wie in citronensaurer Lösung. Das benutzte Präparat war ziemlich wirksam gegen koaguliertes Eiweiß des Hühnereies in schwach alkalischer Lösung (nach der Vorschrift von Merck).

Versuch X.

1,5 g Clupeinsulfat + 0,2 g Papayotin (Merck) + 0,75 ccm $\frac{n}{s}$ -Natronlauge + Wasser bis zu 150 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 46,48 mg N (nach Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	In % des Gesamt-N
$\frac{1}{2}$ Std. bei Zimmertemperatur	2,10	4,52
6 Stunden	4,34	9,34
24 „	4,62	9,94
4 mal 24 „	5,18	11,14
12 „ 24 „	5,32	11,45

In dem folgenden Versuch XI, wo die Wirkung des Papayotins in citronensaurer Lösung (0,2% Citronensäure) untersucht wurde, wurde ein Teil der bei der Titration zugesetzten Lauge für die Neutralisierung der vorhandenen Säure verbraucht. Deshalb geben erst die Zunahmen über den Anfangswert Aufschluß über den Verlauf der Spaltung. Daher sind erst sie in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausgedrückt.

Versuch XI.

1,5 g Clupeinsulfat + 0,2 g Papayotin (Merck) + 3 ccm 10%iger Citronensäurelösung + Wasser bis zu 150 ccm. 20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 47,46 mg N nach (Kjeldahl).

Dauer der Verdauung	N in mg (nach Sørensen)	Zunahme (in mg N)	In % des Gesamt-N
0	10,22	—	—
6 Stunden	11,34	1,12	2,36
24 „	12,04	1,82	3,84
4 mal 24 Std.	12,74	2,52	5,31
7 „ 24 „	12,74	2,52	5,31

Nach den Versuchen X und XI besitzt also das Papayotin dem Clupein gegenüber eine geringe spaltende Wirkung. Die Spaltung ist sehr langsam und wenig umfangreich; sie scheint etwas besser in schwach alkalischer als in citronensaurer Lösung zu verlaufen.

Dieses Ergebnis weicht von demjenigen von Takemura erheblich ab. Der Genannte hat die Wirkung des Papayotins auf Clupeinacetat sowohl in neutraler wie in essigsaurer Lösung nach der Gerbsäuremethode untersucht. In beiden Fällen fand bedeutende Zunahme des durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffs statt. In neutraler Lösung betrug der nicht fällbare Stickstoff am ersten Tage 4,6%, am fünften Tage 41,3% des gesamten Stickstoffs; in essigsaurer Lösung 20,7% am ersten und 44,6% am fünften Tage. Der große Unterschied in den Anfangswerten bei neutraler und essigsaurer Lösung scheint aber dafür zu sprechen, daß es sich bei diesen Versuchen eher um eine Verschiebung der Löslichkeitsverhältnisse als um wirkliche Spaltung handelte. Es fehlen bis jetzt überhaupt Beweise

dafür, daß Papayotin befähigt ist, Eiweiß in größerem Umfange tief abzubauen. Die älteren Versuche bringen dafür keine sicheren Daten. In neuerer Zeit konnte Emmerling⁸⁾ bei Anwendung von 1000 g trockenem Fibrin und 80 g Papayotin nach lange (über sechs Wochen) protrahierter Verdauung aus dem Verdauungsgemisch nur wenige Gramm von krystallinischen Produkten isolieren; das meiste in Lösung gegangene Eiweiß wurde in Form von Albumosen und Peptonen vorgefunden. Als eine Erklärung der äußerst zahlreichen Widersprüche, die in der Literatur über Papayotin vorhanden sind, mag folgendes Zitat von Vines⁹⁾, einem guten Kenner dieses Fermentes, angeführt werden:

«No detailed analysis of the foregoing results is necessary to show that the various samples of papain experimented upon differed widely in their general proteolytic activity, and in their relation as well to acid and alkali as to the various antiseptics employed. Moreover, they account for the conflicting and sometimes contradictory observations not only of Emmerling and myself, but also of earlier observers such as Mendel, Martin and Wurtz. One thing, at any rate, is made clear, that the last word as to the properties of papain will not have been pronounced until a series of careful observations have been made with perfectly fresh material, so as to avoid all those modifications that must necessarily accompany the preparation of the varieties of dried papain which have hitherto been used in experiments.»

Im Anschluß an die angeführten Versuche sollte auch die Wirkung von einigen proteolytischen Organpreßsäften auf Clupein untersucht werden.

Der Hefepreßsaft wurde aus Preßhefe in üblicher Weise bei 300 Atmosphären Druck dargestellt. Der ausgepreßte Saft wurde stets 24 Stunden im Brutschrank gehalten, bevor er für den Versuch verwendet wurde. Neben dem eigentlichen Verdauungsgemisch wurde stets ein Kontrollkolben angesetzt, welcher die gleiche Menge Saft und Säure, aber kein Clupein enthielt. Die Wirkung wurde in salzsaurer und citronensaurer Lösung, in letzterem Fall sowohl am Clupeinsulfat wie Clupein-

acetat verfolgt. Die Ergebnisse der ausgeführten Versuche sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

Versuch XII.

1,5 g Clupeinsulfat + 10 ccm Hefepressaft + 45 ccm $\frac{1}{5}$ -Salzsäure + Wasser bis zu 150 ccm.

Kontrolle: 10 ccm Hefepressaft + 45 ccm $\frac{1}{5}$ -Salzsäure + Wasser bis zu 150 ccm.

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 54,60 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Kontrolle = 10,08 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 44,52 mg Clupein-N.

Dauer der Verdauung	Versuch. N in mg (nach Sörensen)	Kontrolle. N in mg (nach Sörensen)	Versuch ÷ Kontrolle N in mg
0	5,88	4,20	1,68
6 Stunden	5,60	3,64	1,96
24 „	5,74	3,78	1,96

Versuch XIII.

1,5 g Clupeinsulfat + 10 ccm Hefepressaft + 10 ccm 3%iger Citronensäurelösung + Wasser bis zu 150 ccm.

Kontrolle: 10 ccm Hefepressaft + 10 ccm 3%iger Citronensäurelösung + Wasser bis zu 150 ccm.

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 48,72 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Kontrolle = 4,48 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 44,24 mg Clupein-N.

Dauer der Verdauung	Versuch. N in mg (nach Sörensen)	Kontrolle. N in mg (nach Sörensen)	Versuch ÷ Kontrolle N in mg
0	14,70	12,74	1,96
6 Stunden	14,84	13,16	1,68
24 „	14,98	12,88	2,10
6 mal 24 Std.	15,54	13,16	2,38

In den Versuchen XII und XIII konnte somit keine Wirkung konstatiert werden; im Versuch XIV dagegen scheint eine sehr schwache und äußerst langsame Spaltung stattgefunden zu haben. Jedenfalls bleiben die gefundenen Zahlen weit hinter denjenigen von Takemura zurück.

Versuch XIV.

40 ccm ca. 4%iger Clupeinacetatlösung + 10 ccm Hefepressaft + 10 ccm 3%iger Citronensäurelösung + Wasser bis zu 150 ccm.

Kontrolle: 10 ccm Hefepreßsaft + 10 ccm 3%iger Citronensäurelösung + Wasser bis zu 150 ccm.

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 52,36 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Kontrolle = 3,92 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 48,44 mg Clupein-N.

Dauer der Verdauung	Versuch. N in mg (nach Sörensen)	Kontrolle. N in mg (nach Sörensen)	Versuch ÷ Kontrolle	
			in mg N	in % des Clupein-N
0	14,56	11,20	3,36	6,93
24 Stunden	14,98	11,20	3,78	7,80
3 mal 24 Std.	15,12	11,34	3,78	7,80
12 > 24 >	16,10	11,20	4,90	10,12
24 > 24 >	16,38	11,34	5,04	10,40

Als weitere Fermentlösung gelangte zur Untersuchung der Milzpreßsaft, dessen proteolytische Eigenschaften von Hedin¹⁰⁾ entdeckt wurden. Eine frische Rindsmilz wurde fein zerhackt, mit Quarzsand zerrieben, mit Kieselgur vermengt und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Der erhaltene Saft war klar, aber stark rötlich gefärbt. Da infolgedessen die Formoltitrationen unmöglich waren, wurde in diesem Versuch der Verlauf der Spaltung nach der Methode von van Slyke verfolgt.

Versuch XV.

25 ccm ca. 4%iger Clupeinacetatlösung + 10 ccm Milzpreßsaft + 2 ccm 10%iger Essigsäure + Wasser bis zu 100 ccm.

Kontrolle: 10 ccm Milzpreßsaft + 2 ccm 10%iger Essigsäure + Wasser bis zu 100 ccm.

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 63,28 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Kontrolle = 19,04 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 44,24 mg Clupein-N.

Dauer der Verdauung	Versuch. N in mg (nach van Slyke)	Kontrolle. N in mg (nach van Slyke)	Versuch ÷ Kontrolle	
			in mg N	in % des Clupein-N
0	2,18	2,06	0,12	0,27
24 Stunden	5,72	4,00	1,72	3,89
3 mal 24 Std.	6,52	4,00	2,52	5,70
6 > 24 >	9,22	5,46	3,76	8,50
17 > 24 >	9,96	4,75	5,21	11,78

Wie ersichtlich, übt somit der Milzpreßsaft in essigsaurer Lösung bzw. die β -Lieno-Protease Hedins auf Clupein eine unverkennbare, wenn auch langsame proteolytische Wirkung aus. Die betreffenden Angaben von Takemura konnten somit durch meinen Versuch bestätigt werden.

In einem letzten Versuch wurde schließlich das Clupein der Wirkung des Darmpreßsaftes unterworfen. Wie bereits erwähnt, hatte Cohnheim beobachtet, daß Clupein rasch durch Erepsin gespalten wird; genauere Angaben über den Verlauf und Umfang der Spaltung lagen aber bisher nicht vor. Als Erepsinlösung habe ich Darmpreßsaft vom Hunde benutzt. Der Dünndarm von einem frisch getöteten Hunde wurde aufgeschnitten, vom Inhalt befreit und mit Wasser gut abgespült. Sodann wurde die Schleimhaut mit einer Glasscherbe abgeschabt, mit Quarzsand sorgfältig zerrieben, mit Kieselgur vermengt und bei 300 Atmosphären Druck ausgepreßt. Den erhaltenen Saft habe ich direkt als Erepsinlösung benutzt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Versuch XVI.

1,5 g Clupeinsulfat + 10 ccm Erepsinlösung + 3 ccm $n/5$ -Natronlauge + Wasser bis zu 150 ccm.

Kontrolle: 10 ccm Erepsinlösung + 3 ccm $n/5$ -Natronlauge + Wasser bis zu 150 ccm.

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 52,78 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Kontrolle = 7,70 mg N (nach Kjeldahl).

20 ccm der Verdauungsflüssigkeit = 45,08 mg Clupein-N.

Dauer der Verdauung	Versuch. N in mg (nach Sörensen)	Kontrolle. N in mg (nach Sörensen)	Versuch ÷ Kontrolle	
			in mg N	in % des Clupein-N
0	6,72	5,04	1,68	3,73
6 Stunden	20,86	6,02	14,84	32,92
24 „	22,12	5,88	16,24	36,03
3 mal 24 Std.	21,84	6,16	15,68	34,78

Das Erepsin ist somit befähigt, Clupein äußerst schnell und weitgehend abzubauen. Bereits nach Verlauf von 24 Stunden scheint die Spaltung vollständig zu sein.

Die Ergebnisse der mitgeteilten Versuche lassen sich kurz in folgenden Worten zusammenfassen:

1. Trypsin, Pankreatin, Pankreasfistelsaft und Erepsin bewirken eine schnelle und weitgehende Proteolyse des Clupeinmoleküls. Die durch diese Fermente hervorgerufene Spaltung ist an Umfang derjenigen gleich, welche durch Kochen mit starken Mineralsäuren bewirkt wird.

2. Die Spaltung des Clupeins durch β -Lieno-Protease, Papayotin und Hefepreßsaft ist bedeutend weniger umfangreich und verläuft viel langsamer. Am stärksten scheint die Milzprotease, am schwächsten der Hefepreßsaft zu wirken.

3. Pepsin in salzsaurer Lösung bewirkt keine wahrnehmbare Spaltung des Clupeinmoleküls.

Literatur.

1. A. Kossel und A. Mathews, Diese Zeitschrift, Bd. 25, S. 190. 1898.
2. O. Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. 35, S. 134. 1902.
3. M. Takemura, Diese Zeitschrift, Bd. 63, S. 201. 1909.
4. Hedin, Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 341. 1901.
5. Sörensen, Biochem. Zeitschr., Bd. 7, S. 46. 1907.
6. van Slyke, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 43, S. 3170. 1910.
7. O. Cohnheim u. Ph. Klee, Diese Zeitschrift, Bd. 78, S. 464. 1912.
8. Emmerling, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 35, S. 695. 1902.
9. Vines, Annals of Botany, Vol. 19, p. 149. 1905.
10. Hedin, a. a. O.